



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 39/395, 31/13, 31/195, 31/505, A67K 31/675 // C07K 15/28, C12P 21/08</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/49428</p> <p>(43) 国際公開日 1997年12月31日(31.12.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02246</p> <p>(22) 国際出願日 1997年6月27日(27.06.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/167325 1996年6月27日(27.06.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 中村明人(NAKAMURA, Akito)[JP/JP] 赤松健一(AKAMATSU, Kenichi)[JP/JP] 〒412 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, KE, IS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: REMEDIES FOR MYELOMA TO BE USED TOGETHER WITH NITROGEN MUSTARD ANTITUMOR AGENTS</p> <p>(54)発明の名称 ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と組合わせて使用するための骨髄腫治療剤</p> <p>(57) Abstract Remedies for myeloma wherein nitrogen mustard antitumor agents and an anti-IL-6 receptor antibody are used together. Namely, remedies for myeloma containing the anti-IL-6 receptor antibody which are to be used together with the nitrogen mustard antitumor agents; remedies for myeloma containing the nitrogen mustard antitumor agents which are to be used together with the anti-IL-6 receptor antibody; and remedies for myeloma containing the nitrogen mustard antitumor agents and the anti-IL-6 receptor antibody.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

(57) 要約

ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と抗IL-6受容体抗体との併用による、骨髓腫治療剤。すなわち、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と組合わせて使用するための、抗IL-6受容体抗体を含んで成る骨髓腫治療剤；抗IL-6受容体抗体と組合わせて使用するための、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤を含んで成る骨髓腫治療剤；並びにナイトロジェンマスタード系抗癌剤と抗IL-6受容体抗体とを含んで成る骨髓腫治療剤。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア共和国ユーゴス	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ		ラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MR	モリタニア	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CG	コンゴ	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		
		LK	スリランカ	SE	スウェーデン		

## 明 細 書

ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と組合わせて使用するための骨髄腫治療剤

## 技術分野

本発明は、骨髄腫の治療のための、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と抗IL-6受容体抗体との組合せ使用のための医薬組成物に関する。

## 背景技術

ヒト腫瘍の化学療法には、これまでアルキル化剤、代謝拮抗剤、抗腫瘍抗生素、白金化合物等が用いられてきた。これらの抗腫瘍剤を単独で用いても顕著な治療効果が認められない場合、複数の抗腫瘍剤を併用する治療法が考えられてきた(Frei, E. III, Cancer Res. (1992)32, 2593-2607)。アルキル化剤に属する抗癌剤としてナイトロジェンマスタード系抗癌剤が挙げられ、これはナイトロジェンマスタードと称する部分構造を有する抗癌剤の総称であり、この内メルファラン等は抗癌剤として実用されている。

IL-6はB細胞刺激因子2あるいはインターフェロン $\beta$ 2とも呼称された、多機能サイトカインである。IL-6はBリンパ球系細胞の活性化に関与する分化因子として発見され(Hirano, T.ら、Nature(1986) 324, 73-76)、その後、種々の細胞の機能に影響を及ぼす多機能サイトカインであることが明らかとなった(Akira, S.ら、Adv. in Immunology(1993) 54, 1-78)。IL-6は、細胞上で二種のタンパク質を介してその生物学的活性を伝達する。

一つは、IL-6が結合する分子量約80KDのリガンド結合性タンパ

ク質、IL-6 受容体である。IL-6 受容体は、細胞膜を貫通して細胞膜上に発現する膜結合型の他に、主にその細胞外領域からなる可溶性IL-6 受容体としても存在する。もう一つは非リガンド結合性のシグナル伝達に係わる分子量約 130KDの gp130である。IL-6 とIL-6 受容体はIL-6 / IL-6 受容体複合体を形成し、次いでもう一つの膜タンパク質 gp130と結合することにより、IL-6 の生物学的活性が細胞に伝達される (Tagaら、J. Exp. Med. (1987) 166, 967)。

IL-6 受容体に対する抗体 (抗IL-6 受容体抗体) は知られており (Novick, D.ら、Hybridoma(1991) 10, 137-146 Huang, Y.W. ら、Hybridoma(1993) 12, 621-630国際特許出願公開番号 WO 95-09873、フランス特許出願公開番号FR 2694767、米国特許番号US 5216128)、その1つとしてマウス由来のPM-1が知られており (Hirataら、J. Immunology(1989) 143, 2900-2906)、さらにこのマウス抗体の相補性決定領域(complementarity determining region;CDR)をヒト抗体の CDRと置換することにより得られる再構成ヒト抗体も知られている。

しかしながら、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と抗IL-6 受容体抗体とを組合せて骨髓腫治療剤として使用することは知られていない。

## 発明の開示

本発明は、従来知られている骨髓腫治療剤よりも効果的な新しいタイプの骨髓腫治療剤を提供しようとするものである。

本発明者らは、上記の課題を解決するため種々検討した結果、従来から抗癌剤として使われているナイトロジェンマスタード系抗癌剤と、抗IL-6 受容体抗体とを併用することにより、ナイトロジェ

ンマスタード系抗癌剤を単独で使用的場合及び抗ヒトIL-6受容体抗体を単独で使用的場合に比べて骨髓腫治療効果が高いこと、すなわち相乗作用があることを見出し、本発明を完成した。

従って本発明は、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と組合わせて使用するための、抗IL-6受容体抗体を含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

本発明はまた、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と組合わせて使用するための、抗IL-6受容体モノクローナル抗体を含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

本発明はまた、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と組合わせて使用するための、PM-1抗体を含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

本発明はまた、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と組合わせて使用するための、再構成ヒトPM-1抗体を含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

本発明はまた、メクロレタミン、ナイトロジェンマスタードN-オキシド、メルファラン、ウラムスチン、イホスファミド、クロラムブシル又はシクロホスファミドと組合わせて使用するための、抗IL-6受容体抗体を含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

本発明はまた、メルファランと組合わせて使用するための、再構成ヒトPM-1抗体を含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

本発明はまた、抗IL-6受容体抗体と組合わせて使用するための、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤を含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

本発明はまた、抗IL-6受容体モノクローナル抗体と組合わせて使用するための、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤を含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

本発明はまた、PM-1抗体と組合わせて使用するための、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤を含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

本発明はまた、再構成ヒトPM-1抗体と組合わせて使用するための、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤を含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

本発明はまた、抗IL-6受容体抗体と組合わせて使用するための、メクロレタミン、ナイトロジェンマスタードN-オキシド、メルファラン、ウラムスチン、イホスファミド、クロラムブシル又はシクロホスファミドを含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

本発明はまた、再構成ヒトPM-1抗体と組合わせて使用するための、メルファランを含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

本発明はまた、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と抗IL-6受容体抗体とを含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

本発明はまた、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と抗IL-6受容体モノクローナル抗体とを含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

本発明はまた、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤とPM-1抗体とを含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

本発明はまた、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と再構成ヒトPM-1抗体とを含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

本発明はまた、メクロレタミン、ナイトロジェンマスタードN-オキシド、メルファラン、ウラムスチン、イホスファミド、クロラムブシル又はシクロホスファミドと抗ヒトIL-6受容体抗体とを含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

本発明はまた、メルファランと再構成ヒトPM-1抗体とを含んで成る骨髓腫治療剤を提供する。

### 図面の簡単な説明

図 1 は、 $0.1\text{ ng/ml}$ の IL-6 の存在下での、抗ヒト IL-6 受容体抗体の濃度及びメルファランの濃度と、ヒト骨髓腫細胞株の増殖（ $^3\text{H}$  標識チミジンの取込み）との関係を示すグラフである。

図 2 は、 $1\text{ ng/ml}$ の IL-6 の存在下での、抗ヒト IL-6 受容体抗体の濃度及びメルファランの濃度と、ヒト骨髓腫細胞株の増殖（ $^3\text{H}$  標識チミジンの取込み）との関係を示すグラフである。

図 3 は、 $0.1\text{ ng/ml}$ の IL-6 の存在下での、抗ヒト IL-6 受容体抗体の濃度及びアドリアマイシンの濃度と、ヒト骨髓腫細胞株の増殖（ $^3\text{H}$  標識チミジンの取込み）との関係を示すグラフである。

図 4 は、 $1\text{ ng/ml}$ の IL-6 の存在下での、抗ヒト IL-6 受容体抗体の濃度及びアドリアマイシンの濃度と、ヒト骨髓腫細胞株の増殖（ $^3\text{H}$  標識チミジンの取込み）との関係を示すグラフである。

図 5 は、 $0.1\text{ ng/ml}$ の IL-6 の存在下での、抗ヒト IL-6 受容体抗体の濃度及びビンクリスチンの濃度と、ヒト骨髓腫細胞株の増殖（ $^3\text{H}$  標識チミジンの取込み）との関係を示すグラフである。

図 6 は、 $1\text{ ng/ml}$ の IL-6 の存在下での、抗ヒト IL-6 受容体抗体の濃度及びビンクリスチンの濃度と、ヒト骨髓腫細胞株の増殖（ $^3\text{H}$  標識チミジンの取込み）との関係を示すグラフである。

図 7 は、ヒト骨髓腫細胞を移植したマウスにおける、抗ヒト IL-6 受容体抗体(hPM-1) 及びメルファランの単独投与（ $1\text{ mg/kg}$ ）又は併用の場合の生存日数を示すグラフである。

図 8 は、ヒト骨髓腫細胞を移植したマウスにおける、抗ヒト IL-6 受容体抗体(hPM-1) 及びメルファランの単独投与（ $1\text{ mg/kg}$ ）又は併用の場合の Mタンパク量を示すグラフである。

図 9 は、ヒト骨髓腫細胞が移植したマウスにおける、抗ヒト IL-6 受容体抗体(hPM-1) 及びメルファラン（ $3\text{ mg/kg}$ ）の単独投与

又は併用の場合の動物の生存期間を示すグラフであり、併用による相乗効果を示している。

図10は、ヒト骨髓腫細胞を移植したマウスにおける、抗ヒトIL-6受容体抗体(hPM-1)及びメルファランの単独投与及び併用の場合の動物の体重の経過を示すグラフである。

図11は、ヒト骨髓腫細胞を移植したマウスにおける、抗ヒトIL-6受容体抗体(hPM1)単独およびメルファラン単独投与群における、腫瘍移植後30日目での血清Mタンパク量を示すグラフである。

図12は、ヒト骨髓腫細胞を移植したマウスにおける、メルファラン単独および抗ヒトIL-6受容体抗体(hPM1)併用投与群における、腫瘍移植後35日目での血清Mタンパク量を示すグラフである。

図13は、ヒト骨髓腫細胞を移植したマウスにおける、メルファラン単独および抗ヒトIL-6受容体抗体(hPM1)併用投与群における、腫瘍移植後42日目での血清Mタンパク量を示すグラフである。

図14は、ヒト骨髓腫細胞を移植したマウスにおける、メルファラン単独および抗ヒトIL-6受容体抗体(hPM1)併用投与群における、生存期間を生存曲線により示すグラフであり、併用による効果増強を示している。

図15は、ヒト骨髓腫細胞を移植したマウスにおける、抗ヒトIL-6受容体抗体(hPM1)単独投与群における、動物の体重の経過を示すグラフである。

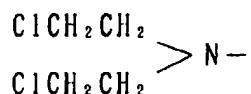
図16は、ヒト骨髓腫細胞を移植したマウスにおける、メルファラン単独および抗ヒトIL-6受容体抗体(hPM1)併用投与群における、動物の体重の経過を示すグラフである。

#### 発明の実施の形態

本発明において使用するナイトロジェンマスタード系抗癌剤とは



、次の構造：



を有するナイトロジェンマスタードと称する部分構造を有する抗癌剤の総称であって、これには例えば、

メクロレタミン(mechlorethamine)、

ナイトロジェンマスタードN-オキシド(nitrogen mustard N-oxide) (メチルービス(β-クロロエチル)アミンN-オキシド塩酸塩; methyl-bis(β-chloroethyl) amine N-oxide hydrochloride)

メルファラン(melphalan) (p-[ビス(2-クロロエチル)アミノ]-L-フェニルアラニン; p-[bis(2-chloroethyl) amino]-L-phenylalanine)、

クロラムブシル(chlorambucil) (p-ビス(2-クロロエチル)アミノ-フェニル酪酸; p-bis(2-chloroethyl) amino-phenylbutyric acid)、

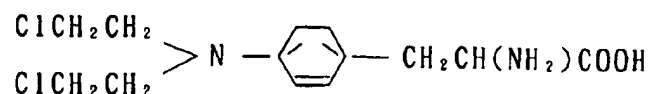
ウラムスチン(uramustin) (5-ビス(2-クロロエチル)アミノウラシル; 5-bis(2-chloroethyl) aminouracil)、

イホスファミド(ifosfamide) (N, N'-ビス(2-クロロエチル)-N', O-プロピレンリン酸エステルジアミド; N, N'-bis(2-chloroethyl)-N', O-propylenephosphoric acid ester diamide)、

シクロホスファミド(cyclophosphamide) (N, N-ビス(β-クロロエチル)-N', O-プロピレンリン酸エステルジアミド; N, N-bis(β-chloroethyl)-N', O-propylenephosphoric acid ester diamide)

等が含まれる。本発明において、これらのナイトロジェンマスター

ド系抗癌剤は、一種類あるいはそれら自身複数の組み合わせで使用する事ができる。この内、メルファランは、サルコリシン (sarc olysine)又はフェニルアラニンマスタード(L-phenylalanine musta rd)とも称され、次の構造を有する。



メクロレタミン(mechlorethamine)は公知の方法、例えばAbrams et al., J. Soc. Chem. Ind. (London) (1949) 68, 280に記載の方法により得ることができる。

ナイトロジェンマスタードN-オキシド(nitrogen mustard N-o xide)は公知の方法、例えばAiko et al., J. Pharm. Soc. Japan (1952) 72, 1297により得ることができる。

メルファラン(melphalan)は公知の方法、例えばBergel, F. et al., J. Chem. Soc. (1954) 2409 に記載の方法により得ることができる。

クロラムブシル(chlorambucil)は公知の方法、例えばBalazs, M. K. et al., J. Pharm. Sci. (1970) 59, 563に記載の方法で得ることができる。

ウラムスチン(uramustin)は公知の方法、例えばLyttle and Pet ering, J. Am. Chem. Soc. (1958) 80, 6459 に記載の方法で得ることができる。

イホスファミド(ifosfamide)は公知の方法、例えばArnold H. et al., U. S. pat. (1973 to Asta) 3, 732, 340またはBrassfie ld, H. A. et al., J. Am. Chem. Soc. (1975) 97, 4143に記載の方法により得ることができる。

また、シクロホスファミド(cyclophosphamide)は公知の方法、

例えばArnold H. et al., Angew. Chem. (1958) 70, 539に記載の方法により得ることができる。

### 1. 抗IL-6受容体抗体

本発明で使用される抗IL-6受容体抗体は、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と併用されることにより、抗IL-6受容体抗体単独で使用される場合及びナイトロジェンマスタード系抗癌剤単独で使用される場合に比べて高い骨髄腫治療効果を有するものであれば、その由来、種類（モノクローナル、ポリクローナル）および形状を問わない。

本発明で使用される抗IL-6受容体抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗IL-6受容体抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生される抗体、および、抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生される組換え型抗体がある。本発明で使用される抗IL-6受容体抗体はIL-6受容体と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6のシグナル伝達を遮断し、IL-6の生物学的活性を阻害する抗体である。

このような抗体としては、PM-1抗体（Hirata, et al., J. Immunology (1989) 143, 2900-2906）あるいは AUK12-20抗体、 AUK64-7抗体またはAUK146-15抗体（国際特許出願公開番号 WO 92-19759）等が挙げられる。これらのうちで、特に好ましい抗体としてPM-1抗体が挙げられる。

なお、PM-1抗体産生ハイブリドーマ細胞株は、PM-1として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成2年7月10日に、FERM BP-2998としてブダペスト

条約に基づき国際寄託されている。

## 2. ハイブリドーマに産生される抗体

モノクローナル抗体は、基本的には公知技術を使用し、以下のようにしてハイブリドーマを作製して得ることができる。すなわち、IL-6 受容体を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるIL-6 受容体は、由来となる動物種に制限されないがヒト由来のIL-6 受容体が特に好ましい。ヒトIL-6 受容体は、欧州特許出願公開番号 EP 325474 号に開示された遺伝子配列を用いてIL-6 受容体蛋白質を得ることができる。IL-6 受容体は、細胞膜上に発現しているIL-6 受容体と細胞膜から離脱しているIL-6 受容体（可溶性IL-6 受容体；Yasukawa et al., J. Biochem. (1990), 108, 673-676)の二種類がある。

可溶性IL-6 受容体は細胞膜に結合しているIL-6 受容体の主に細胞外領域から構成されており、細胞膜貫通領域あるいは細胞膜貫通領域および細胞内領域が欠損している点で膜結合型IL-6 受容体と異なっている。本発明において、感作抗原として使用されるIL-6 受容体はこれら細胞膜上に結合しているIL-6 受容体および可溶性IL-6 受容体のいずれでもよい。また、それらの変異体であってもよい。

IL-6 受容体をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入

して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または、培養上清中から目的のIL-6受容体蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6受容体蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6受容体蛋白質を発現する細胞を感作抗原として使用してもよい。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えばサルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS（Phosphate-Buffered Saline）や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエ

ローマ細胞としては、既に公知の種々の細胞株、例えば、P 3 (P3 x63Ag8.653) (Kearney, J. F. et al., J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8.U1 (Yelton, D. E. et al., Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2 / 0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. and Scheidegger, D., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133)等が好適に使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法 (Galfre G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、センダイウィルス(HVJ)等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清(FCS)等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培

養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温した PEG溶液、例えば、平均分子量1000-6000程度の PEG溶液を通常、30-60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

当該ハイブリドーマは、通常の実験培養液、例えば HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該 HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが行われる。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroでIL-6受容体蛋白質またはIL-6受容体蛋白質発現細胞により感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、IL-6受容体への結合活性および中和活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特公平1-59878 参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるIL-6受容体またはIL-6受容体発現細胞を免疫して抗IL-6受容体抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いてIL-6受容体に対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号 WO 92-03918、WO 93-12227、WO 94-02602、WO 94-25585、WO 96-33735 および WO 96-34096 参照）。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブ

リドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に移植して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子 (oncogene) により不死化させた細胞を用いてもよい。

### 3. 組換え型抗体

モノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる。例えば、組換え型抗体は、抗体遺伝子をハイブリドーマまたは抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明には、この組換え型抗体を用いることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。

具体的には、抗IL-6受容体抗体を産生するハイブリドーマから、抗IL-6受容体抗体の可変領域（V領域）をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299）、AGPC法（Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159）等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit（Pharmacia）等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、



QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia) を用いることにより mRNA を直接調製することもできる。

得られた mRNA から逆転写酵素を用いて抗体 V 領域の cDNA を合成する。cDNA の合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業) 等を用いて行うこともできる。また、cDNA の合成および増幅を行うには 5' - Ampli FINDER RACE Kit (Clontech) およびポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction ; PCR) を用いた 5' - RACE 法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002 ; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) を使用することができる。

得られた PCR 産物から目的とする DNA 断片を精製し、ベクター DNA と連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とする DNA の塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認する。

目的とする抗 IL-6 受容体抗体の V 領域をコードする DNA が得られれば、これを所望の抗体定常領域 (C 領域) をコードする DNA と連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体の V 領域をコードする DNA を、抗体 C 領域の DNA を既に含む発現ベクターに組み込んでよい。抗体 C 領域としては、V 領域と同じ動物種由来の抗体 C 領域を用いてもよいし、V 領域と異なる動物種由来の抗体 C 領域を用いてもよい。

本発明で使用される抗 IL-6 受容体抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。

抗体遺伝子の発現は、抗体の重鎖（H鎖）または軽鎖（L鎖）をコードする DNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードする DNAを単一の発現ベクターに組み込んで、宿主細胞を形質転換させてもよい（国際特許出願公開番号 WO 94-11523 参照）。

#### 4. 改変抗体

本発明で使用される組換え型抗体は、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として遺伝子工学的手法を用いて作製した改変抗体を使用することができる。改変抗体はヒト抗体C領域を有し、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト型化（Humanized）抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た、ヒト抗体以外の抗体V領域をコードする DNAをヒト抗体C領域をコードする DNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号 EP 125023、国際特許出願公開番号 WO 92-19759 参照）。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

例えば、PM-1 抗体のL鎖V領域またはH鎖V領域を含むプラスミドは各々、pPM-k3およびpPM-h1と命名され、このプラスミドを有する大腸菌は、National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited に、1991年2月11日に、各々NCIMB40366およびNCIMB40362としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子

組換え手法も知られている（欧州特許出願公開番号 EP 125023、国際特許出願公開番号 WO 92-19759 参照）。

具体的には、マウス抗体の CDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region; FR）を連結するように設計した DNA配列を、末端部で互いにオーバーラップする部分を有する数本のオリゴヌクレオチドに分割して合成し、PCR法により一本に統合した DNAに合成する。得られた DNAをヒト抗体 C 領域をコードする DNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号 EP 239400、国際特許出願公開番号 WO 92-19759 参照）。

CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、CDRが良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、ヒト型化抗体の CDR が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の V 領域のFRのアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

本発明に使用されるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化 PM-1 抗体が挙げられる（国際特許出願公開番号 WO 92-19759 参照）。ヒト型化 PM-1 抗体は、マウス由来の PM-1 抗体の CDRを、L 鎖についてはヒト抗体 RE1のFRと、H 鎖についてはヒト抗体 NEWのFRと連結し、抗原結合活性を有するようにFRのアミノ酸残基を一部置換したものである。

本発明で使用される抗 IL-6 受容体抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。

抗体遺伝子の発現は、抗体の重鎖（H 鎖）または軽鎖（L 鎖）をコードする DNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時

形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで、宿主細胞を形質転換させてもよい（国際特許出願公開番号 WO 94-11523 参照）。

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物抗体由来のV領域とヒト抗体由来のC領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物抗体由来のCDRとヒト抗体由来のFRおよびC領域からなり、ヒト以外の哺乳動物に由来するアミノ酸配列が最小限度に減少しているため、ヒト体内における抗原性が低下し、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

使用されるヒト抗体C領域としては、例えば、C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3, C $\gamma$ 4を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

#### 5. 抗体断片および抗体修飾物

本発明で使用する抗体は、IL-6受容体に結合することにより、IL-6とIL-6受容体の結合を阻害してIL-6のシグナル伝達を遮断し、IL-6の生物学的活性を阻害するかぎり、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。これらは、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と併用されることにより、抗IL-6受容体抗体単独で 사용되는場合及びナイトロジェンマスタード系抗癌剤単独で 사용되는場合に比べて、高い骨髄腫治療効果を有する抗体断片や抗体修飾物である。

例えば、抗体断片としては、Fab, F(ab')<sub>2</sub>, FvまたはH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immun

ol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137 参照)。

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリッカーを介して連結される (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリッカーとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

scFvをコードする DNAは、前記抗体のH鎖または、H鎖V領域をコードする DNA、およびL鎖または、L鎖V領域をコードする DNAを鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードする DNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いて PCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリッカー部分をコードする DNAおよびその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

一旦scFvをコードする DNAが作製されれば、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、scFvを得ることができる。

また、抗体断片は、一部の配列が変異、置換、欠失または挿入を受けた抗体断片であってよい。これら抗体断片は、前記と同様にし

てその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体断片も包含される。

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗IL-6受容体抗体を使用することもできる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

#### 6. 組換え型抗体、改変抗体、または抗体断片の発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター／エンハンサー、発現させる抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAを含む発現ベクターにて発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー(human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer)を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40(SV 40)等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1 $\alpha$ (HEF1 $\alpha$ )などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV 40プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulligan, R. C.らの方法(Nature (1979) 277, 108-114)、また、HEF1 $\alpha$ プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima,

S.らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、*lacZ*プロモーター、*araB*プロモーターを挙げることができる。*lacZ*プロモーターを使用する場合、Ward, E. S.らの方法 (Nature (1989) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) に、また*araB*プロモーターを使用する場合、Better, M.らの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、*pelB*シグナル配列 (Lei, S. P. et al., J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383) を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切に組み直して (refold) 使用する (例えば、国際特許出願公開番号 WO 96-30394 参照)。

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来の複製起源を用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができ、抗体製造のための産生系は、*in vitro*および *in vivo*の産生系がある。

*in vitro*の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細

胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO, COS、ミエローマ、BHK (babyhamster kidney), HeLa, Vero、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9, sf21, Tn5 が知られている、植物細胞としては、例えば、ニコティアナ(Nicotiana) 属、詳しくは、ニコティアナ タバカム(Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、(1) 酵母、例えば、サッカロミセス(Saccharomyces) 属、詳しくは、サッカロミセス セレビジエ(Saccharomyces cerevisiae)、あるいは(2) 糸状菌、例えば、アスペルギルス(Aspergillus) 属、詳しくは、アスペルギルス ニガー(Aspergillus niger) が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌(Escherichia coli)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をin vitroで培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、哺乳類細胞用の培養液として、DMEM, MEM, RPMI1640, IMDM等を使用することができる。その際、牛胎児血清(FCS)等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移植することにより、in vivoにて抗体を産生してもよい。

in vivoの産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫



を用いる産生系がある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Glaster, V., SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。

哺乳類を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。例えば、抗体遺伝子をヤギ $\beta$ カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含む DNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。(Ebert, K. M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

また、昆虫としては、カイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Maeda, S. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えば pMON530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム チューメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコティアナ タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Ma, J. K. et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

これらの動物または植物に上記のように抗体遺伝子を導入し、動

物または植物の体内で抗体を産生させ、回収する。

上述のように *in vitro* または *in vivo* 産生系にて抗体を産生する場合、抗体 H 鎖または L 鎖をコードする DNA を別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよい。あるいは H 鎖および L 鎖をコードする DNA を単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい（国際特許出願公開番号 WO 94-11523 参照）。

#### 7. 抗体の分離、精製

前記のように発現、産生された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる（Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）。

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテイン A カラム、プロテイン G カラムが挙げられる。例えば、プロテイン A カラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia) 等が挙げられる。

アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる。（Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 19

96)。これらのクロマトグラフィーはHPLC, FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

#### 8. 抗体の濃度測定

上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定または酵素結合免疫吸着検定法 (enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA)等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、得られた抗体を PBSで適当に希釈した後、280nmの吸光度を測定し、種およびサブクラスにより吸光係数は異なるが、ヒト抗体の場合  $1 \text{ mg/ml}$ を  $1.40\text{D}$ として算出する。

また、ELISAによる場合は以下のように測定することができる。すなわち、 $0.1\text{M}$ 重炭酸緩衝液 (pH 9.6) で  $1 \mu\text{g/ml}$ に希釈したヤギ抗ヒト IgG抗体  $100 \mu\text{l}$ を96穴プレート (Nunc) に加え、 $4^\circ\text{C}$ で一晩インキュベーションし、抗体を固相化する。ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用される抗体または抗体を含むサンプル、あるいは濃度標準品として既知の濃度のヒト IgG  $100 \mu\text{l}$ を添加し、室温にて1時間インキュベーションする。

洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG抗体  $100 \mu\text{l}$ を加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad)を用いて  $405\text{nm}$ での吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を濃度標準ヒト IgGの吸光度より算出する。

また、抗体の濃度測定には、BIAcore (Pharmacia) を使用することができる。

#### 9. 抗体の活性の確認

本発明で使用される抗IL-6受容体抗体の活性の評価は、通常知られた方法を使用することができる。IL-6反応性細胞例えば、NH 60, BSF2を培養したプレートにIL-6を添加する。ついて抗IL-6

受容体抗体を共存させることにより、IL-6 依存性細胞の  $^3\text{H}$  標識チミジン取り込みを指標として評価すればよい。

また、IL-6 受容体発現細胞例えば、U266を培養したプレートに、 $^{125}\text{I}$  標識IL-6 と抗IL-6 受容体抗体を加える。そして、IL-6 受容体発現細胞に結合した  $^{125}\text{I}$  標識IL-6 を測定することにより、評価すればよい (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

また、本発明で使用される抗IL-6 受容体抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA, EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光抗体法を用いることができる。

例えば、ELISAを用いる場合、IL-6 受容体に対する抗体を固相化した96穴プレートにIL-6 受容体を添加し、次いで目的の抗IL-6 受容体抗体を含む試料、例えば、抗IL-6 受容体抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した、目的の抗IL-6 受容体抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。IL-6 受容体として可溶性IL-6 受容体を使用してもよい。

本発明で使用される抗IL-6 受容体抗体のリガンドレセプター結合阻害活性を測定する方法としては、通常のCell ELISA、あるいは、リガンドレセプター結合アッセイを用いることができる。

例えば、Cell ELISA法の場合、IL-6 受容体を発現する細胞を96穴プレートで培養して接着させ、パラホルムアルデヒドなどで固定化する。あるいは、IL-6 受容体を発現する細胞の膜分画を調製して固相化した96穴プレートを作製する。これに、目的の抗IL-6 受容体抗体を含む試料、例えば、抗IL-6 受容体抗体産生細胞の培養

上清や精製抗体と、放射性同位元素、例えば、 $^{125}\text{I}$ 等で標識したIL-6を添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、放射活性を測定することでIL-6受容体に結合したIL-6量を測定でき、抗IL-6受容体抗体のリガンドレセプター結合阻害活性を評価することができる。

例えば、細胞上のIL-6受容体に対するIL-6の結合阻害アッセイには、IL-6受容体を発現する細胞を遠心分離等の手段で分離した後、細胞懸濁液として調製する。放射性同位元素、例えば、 $^{125}\text{I}$ 等で標識したIL-6の溶液、あるいは非標識のIL-6と標識IL-6の混合溶液と、濃度調製した抗IL-6受容体抗体を含む溶液を細胞懸濁液に添加する。一定時間の後、細胞を分離し、細胞上に結合した標識IL-6の放射活性を測定すればよい。

上記抗体の活性評価には、BIAcore (Pharmacia) を使用することができる。

#### 10. 投与方法および製剤

本発明によれば、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と抗IL-6受容体抗体とを組合わせて使用する。「組合わせて使用する」とは、それぞれの医薬組成物を異なる時間に投与する場合、それぞれの医薬組成物を同時に投与する場合、及びナイトロジェンマスタード系抗癌剤及び抗IL-6受容体抗体の両者を含んで成る1種類の医薬組成物を投与する場合、を意味する。前二者の場合、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤を含んで成る医薬組成物と抗IL-6受容体抗体を含んで成る医薬組成物とを同一の投与経路で投与してもよく、又は別の投与経路で投与してもよい。これらの医薬組成物は各々、病気に既に悩まされる患者に、病気の症状を治癒するか、あるいは少なくとも部分的に阻止するために十分な量で投与される。また、投与期間は患者の年齢、症状により適宜選択することができる。

抗IL-6受容体抗体を含んで成る医薬組成物は、好ましくは、非経口的に、たとえば、静脈内注射あるいは点滴、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身あるいは局部的に投与することができる。局所投与形態として外用剤、局所注射剤などが好適に実施し得る。外用剤としては、軟膏、ゲル、クリーム、乳液、液剤などの塗布剤、テープ剤、パッチ剤などの貼付剤、あるいはスプレー剤、粉剤などの噴霧剤から選択される。

抗IL-6受容体抗体の有効投与量としては、1日につき体重1kg当たり0.001mgから1000mgの範囲で選ばれる。好適には体重1kg当たり0.01mgから50mgの範囲で選ばれる。前述の投与量は症状によっても異なり、これらの値に限定されるものでは勿論ない。投与回数としては通常1日1ないし2回、2ないし数日に1回、もしくは1週ないし4週に1回の範囲で選ばれるが、これに限定されるものではない。

ナイトロジェンマスタード系抗癌剤を含んでなる医薬組成物は、経口的に投与することが好ましいが、有効成分の性質、患者の状態、などにより非経口的に投与することもできる。たとえば、静脈内注射あるいは点滴、動脈内注射、筋肉内注射、腫瘍内注射、胸腔あるいは腹腔内注射にて全身あるいは局所に投与することができる。

ナイトロジェンマスタード系抗癌剤の有効投与量は、有効成分の種類により異なるが、たとえばメルファランでは、1日あたり1～20mgを連日あるいは週に1～6回経口投与、または大量静注療法として20～200 mg/m<sup>2</sup>を単回ないし複数回投与する。また、シクロホスファミドでは、1回50～2000mgを経口あるいは静脈内にて、通常週1～5回、もしくは2週ないし月に1回投与する。なお、投与回数ないし投与スケジュールは、ここにあげた例に限定されるものではない。また、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤は、単独で投

与されるのみならずビンクリスチン、アドリアマイシン、プレドニソロンなどと適宜併用することができる。

ナイトロジェンマスタード系抗癌剤を含んでなる医薬組成物と抗ヒトIL-6受容体抗体とを同時に投与する場合、その比率は、患者の状態、投与スケジュールなどにより異なるが、たとえば、メルファラン連日経口投与と組み合わせた場合、メルファランの投与量に対し0.01~1000倍（重量比）の範囲で選ばれる。また、両者を一定の割合で含んでなる医薬組成物を投与することもできる。ただし、前述のとおり、患者の病状などにより異なり、ここにあげた投与比率に限定されるものではない。

ナイトロジェンマスタード系抗癌剤を含んでなる医薬組成物と抗IL-6受容体抗体とを別々の時点で投与するスケジュールを組むこともできる。たとえば、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤あるいは同剤を構成要素とする併用療法を施すことにより、寛解を導入した患者に対し、寛解維持を目的として抗IL-6受容体抗体を投与することができる。また、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤あるいは同剤を構成要素とする併用療法と抗IL-6受容体抗体投与とを1~4週間ごとに繰り返すことができる。ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と抗IL-6受容体抗体では、前者を先に投与するスケジュールが好ましいが、患者の状態などにより後者を先に投与することもできる。

本発明の、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤を含んで成る医薬組成物、抗IL-6受容体抗体を含んで成る医薬組成物、並びにナイトロジェンマスタード系抗癌剤と抗IL-6受容体抗体とを含んで成る医薬組成物は、投与経路により異なるが、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

このような担体及び医薬添加物の例として、水、医薬的に許容さ

れる有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン(HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容され得る界面活性剤などがあげられる。

実際の添加物は本発明治療剤の剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組み合わせて選ばれるが、もちろんこれらに限定するものではない。

本発明はまた、本発明の薬剤と他の薬剤、生物学的製剤や合成医薬製剤などとの、同時もしくは逐次的併用投与をも包含する。他の薬剤としては、抗炎症薬や抗アレルギー薬、抗血小板薬、他の抗腫瘍薬あるいは本発明の目的である活性を増強もしくは補助するような薬剤の中から選ばれる。

#### 実施例

以下、参考例、実験例および実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 参考例 1. 抗ヒトIL-6 受容体抗体PM-1 の調製

Hirataらの方法(J. Immunol.(1989) 143, 2900-2906)により作成した抗IL-6 受容体抗体MT18をCNBrにより活性化させたセファロース 4 B (Pharmacia Fine Chemicals製、Piscataway, NJ) と添付の処方にしたがって結合させ、IL-6 受容体(Yamasakiら、Science(1988) 241, 825-828)を精製した。



すなわち、ヒトミエローマ細胞株U266を1%ジギトニン(Wako chemicals製)、10mMトリエタノールアミン(pH 7.8)および0.15M NaClを含む1mM p-パラアミノフェニルメタンスルフォニルフルオリドハイドロクロリド(Wako Chemicals製)(ジギトニン緩衝液)で可溶化し、セファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合した。その後、ビーズをジギトニン緩衝液で6回洗浄し、免疫に用いる部分精製IL-6受容体とした。

BALB/cマウスを $3 \times 10^6$ 個のU266細胞から得た上記部分精製IL-6受容体で10日おきに4回免疫し、その後常法によりハイブリドーマを作成した。成長陽性ウェルからのハイブリドーマ培養上清を下記の方法にてIL-6受容体への結合活性を調べた。 $5 \times 10^5$ 個のU266細胞を $^{35}\text{S}$ -メチオニン(2.5mCi)で標識し、上記ジギトニン緩衝液で可溶化した。

可溶化したU266細胞を0.04ml容量のセファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合し、その後、ジギトニン緩衝液で6回洗浄し、0.25mlのジギトニン緩衝液(pH 3.4)により $^{35}\text{S}$ -メチオニン標識IL-6受容体を流出させ、0.025mlの1M Tris(pH 7.4)で中和した。0.05mlのハイブリドーマ培養上清を0.01mlのProtein Gセファロース(Pharmacia製)と混合した。

洗浄した後、セファロースを上記で調製した0.005mlの $^{35}\text{S}$ -標識IL-6受容体溶液とともにインキュベートした。免疫沈降物質をSDS-PAGEで分析し、IL-6受容体と反応するハイブリドーマ培養上清を調べた。その結果、反応陽性ハイブリドーマクローンPM-1を樹立した。ハイブリドーマPM-1から産生される抗IL-6受容体抗体PM-1は、IgG1 $\kappa$ 型のサブタイプを有する。

ハイブリドーマPM-1が産生する抗体のヒトIL-6受容体に対するIL-6の結合阻害活性をヒトミエローマ細胞株U266を用いて調べ

た。ヒト組換え型 IL-6 を大腸菌より調製し (Hiranoら、Immunol. Lett. (1988) 17, 41)、ボルトン-ハンター試薬 (New England Nuclear, Boston, MA) により  $^{125}\text{I}$  標識した (Tagaら、J. Exp. Med. (1987) 166, 967)。

$4 \times 10^5$  個の U266 細胞を、100 倍量の過剰な非標識 IL-6 の存在下で室温にて、1 時間、70% (v/v) のハイブリドーマ PM-1 の培養上清及び 14000 CPM の  $^{125}\text{I}$  標識 IL-6 とともに培養した。70  $\mu\text{l}$  のサンプルを 400  $\mu\text{l}$  のマイクロフュージポリエチレンチューブに入れた 300  $\mu\text{l}$  の FCS 上に重層し、遠心の後、細胞上の放射活性を測定した。その結果、ハイブリドーマ PM-1 が産生する抗体は、IL-6 の IL-6 受容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

#### 参考例 2. 再構成ヒト PM-1 抗体の作成

再構成ヒト PM-1 抗体を国際特許出願公開番号 WO 92-19759 に記載の方法により得た。参考例 1 で作成されたハイブリドーマ PM-1 から常法で全 RNA を調製し、これより一本鎖 cDNA の合成を行った。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法によりマウス PM-1 の V 領域の DNA を増幅した。PCR 法に使用するプライマーは S. T. Jones ら、Bio/Technology, 9, 88, 1991 に記載されたものを用いた。

PCR 法により増幅した DNA 断片を精製し、マウスカッパ型 L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含む DNA 断片、及びマウスガンマ型 H 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含む DNA 断片を得た。これらの DNA 断片をプラスミド pUC19 に連結し、大腸菌 CH5  $\alpha$  のコンピテント細胞に導入して大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体から上記プラスミドを得、プラスミド中の V 領域コード領域の塩基配列を、常法にしたがい決定し、さらに各 V 領域の相補性決定領域 (CDR) を決定した。

キメラPM-1抗体を発現するベクターを作製するため、それぞれマウスPM-1  $\kappa$  L鎖及びH鎖のV領域をコードするcDNAをHCMV発現ベクターに挿入した。再構成ヒトPM-1抗体を作製するために、CDR移植法によりマウスPM-1のV領域 CDRをヒト抗体へ移植した。ヒト型化抗体の CDRが適切な抗原結合部位を形成するように抗体のV領域のフレームワーク領域 (FR) のアミノ酸を置換した。

このようにして作製した再構成ヒトPM-1抗体のL鎖およびH鎖の遺伝子を哺乳類細胞中で発現させるために、ヒトエロンゲーションファクター1  $\alpha$  (HEF-1  $\alpha$ ) プロモーターを含有するベクターに各々導入し、再構成ヒトPM-1抗体L鎖およびH鎖を発現するベクターを作製した。これら二つの発現ベクターを CHO細胞に同時に遺伝子導入することにより、再構成ヒトPM-1 (hPM-1) 抗体を産生する細胞株を樹立した。得られた hPM-1 のヒトIL-6受容体への結合能は ELISAにて確認した。さらに、hPM-1はマウス抗体およびキメラ抗体と同様に、ヒトIL-6のヒトIL-6受容体への結合を阻害した。

#### 実施例 1. ヒト骨髓腫細胞の増殖に関する抗ヒトIL-6受容体抗体と化学療法剤の併用効果

骨髓腫の治療に用いられている化学療法剤であるアドリアマイシン (adriamycin, ADR, 協和発酵製)、ビンクリスチン (vincristine, VCR, Sigma Chemical Co. 製)、メルファラン (melphalan, L-PAM, Sigma Chemical Co. 製) に対する KPMM2細胞の感受性に関する抗ヒトIL-6受容体抗体の影響を調べた。

KPMM2は、ヒト骨髓腫患者腹水に由来する多発性骨髓腫細胞株である (特開平7-236475参照)。本骨髓腫患者は、MCNU (ranimustine) およびMP (melphalan, prednisolone) 療法により寛解を維持していたが再発し、VAD (vincristine, adriamycin, dexamethasone)

療法を施行したが無効であった症例である。KPM2細胞の増殖は、IL-6により促進されるとともに、抗IL-6抗体あるいは抗IL-6受容体抗体により著明に阻害される（臨床血液（1994）35, 1361-1365）。なお、細胞の増殖活性は、 $^3\text{H}$ 標識チミジン（Amersham製）の細胞内取り込み量により評価した。

継代していたKPM2細胞を新鮮培地（20% FBS添加RPMI1640）にてよく洗浄後  $4 \times 10^5$  /mlとし、これを96ウェル平底面マイクロタイタープレート（Falcon製）に50  $\mu\text{l}$  ずつ分注した。さらに、組換え型ヒトIL-6（Asagoe, Y.ら、Bio/Technology(1988) 6, 806-809）、抗ヒトIL-6受容体抗体 hPM-1（前記参考例および国際特許出願公開番号 WO 92-15759 参照）および上記化学療法剤を含む培地あるいはコントロールとして新鮮培地を添加し、各ウェル 200  $\mu\text{l}$  とした。

このプレートを37℃、5%  $\text{CO}_2$ 存在加湿下において4日間培養した。培養終了4時間前に  $^3\text{H}$ 標識チミジン溶液（100  $\mu\text{Ci/ml}$ ）を各ウェル10  $\mu\text{l}$  ずつ添加して、引き続き4時間培養した。培養終了後、ハーベスター（Micro 96 Harvester, SKATRON instruments製）により細胞をガラスフィルター（Printed Filtermat A, WALLAC製）上に回収し、これをマイクロベータ（1450 MicroBeta, WALLAC製）にて測定した。

KPM2の増殖に対する抑制作用は、化学療法剤単独での効果をコントロールとして表記した。すなわち、各濃度の化学療法剤を添加した実験群での細胞内  $^3\text{H}$ 標識チミジン取り込み量を100とし、抗ヒトIL-6受容体抗体を同時に添加した実験群での細胞内  $^3\text{H}$ 標識チミジン取り込み量を指数で比較した。

その結果、同じ濃度の抗ヒトIL-6受容体抗体存在下で、化学療法剤の濃度との関係を比較すると、アドリアマイシンとビンクリス

チンはその濃度によらずほぼ一定であった（図3～図6）のに対し、メルファランは濃度を高くするに伴って増殖指数が低下した（図1及び図2）。IL-6が1 ng/ml存在する条件では、10  $\mu$ g/mlの抗IL-6受容体抗体単独での増殖指数は33.9であったが、1  $\mu$ g/mlのメルファランが共存すると15.5にまで低下した。IL-6が0.1 ng/mlの条件においても同様であり、抗体単独での指数が28.4、1  $\mu$ g/mlのメルファラン共存下が15.9であった。したがって、抗IL-6受容体抗体とメルファランとの併用は相乗的效果が認められた。

#### 実施例2. ヒト骨髓腫細胞のSCIDマウス移植系における抗ヒトIL-6受容体抗体と化学療法剤の併用効果

実施例1により、抗ヒトIL-6受容体抗体は化学療法剤の抗腫瘍効果を増強することが示された。その中でも、相乗的に作用することが明らかになったメルファラン（Sigma Chemical Co.製）を用いて、*in vivo*での併用効果を調べた。

抗腫瘍活性の評価には、Xenograftモデル動物を用いた。すなわち、多発性骨髓腫患者の腹水に由来するヒト骨髓腫細胞株 KPMM2を、雄SCIDマウス（FOX CHASE C. B17/lcr-Scid Jcl, 日本クレアから購入）に尾静脈から移植した。このとき腫瘍細胞は、骨髓にて増殖し、末梢血中に myelomaタンパク（Mタンパク）を産生するようになる。さらに、本モデル系は骨障害・血中カルシウムの上昇など、ヒトの多発性骨髓腫の主要な症状を示すことから、きわめて臨床に近いモデルである。

移植する骨髓腫細胞は、*in vivo*継代していた KPMM2細胞を細切後、メッシュに通して単細胞懸濁液としたものを用いた。細胞密度は $3 \times 10^7$  /mlに調製し、マウス1匹あたり 0.2mlずつ尾静脈より移植した（マウス1匹あたり  $6 \times 10^6$  個）。なお、この細胞移植日

を day 0 とした。

抗ヒト IL-6 受容体抗体 hPM-1 は、12.1mg/ml にて保存していた原液を滅菌リン酸緩衝液にて希釈し、5 mg/ml とした。これをマウス 1 匹あたり 0.2ml ずつ尾静脈より day 8 に投与した（マウス 1 匹あたり 1 mg）。対照群には、抗体を含まない滅菌リン酸緩衝液を同様に投与した。

メルファラン（melphalan, L-PAM, Sigma Chemical Co. 製）は、0.2% CMC（カルボキシメチルセルロース）水溶液に懸濁して 0.3 あるいは 0.1mg/ml として用いた。これをマウス体重 10 g あたり 0.1ml（3 あるいは 1 mg/kg weight）ずつ day 1 から 5 日間連日経口投与した。対照群には、メルファランを含まない 0.2% CMC 水溶液を同様に投与した。

実験は、以下の 6 群にておこなった。（1）メルファランおよび抗体非投与群、（2）メルファラン 1 mg/kg 単独投与群、（3）メルファラン 3 mg/kg 単独投与群、（4）抗体単独投与群、（5）メルファラン 1 mg/kg および抗体併用群、（6）メルファラン 3 mg/kg および抗体併用群。第 1 群は、一群 9 匹とし、それ以外の群は 7 匹とした。また、同一系統、同一購入日のマウスを腫瘍移植せずに飼育し、Mタンパク検出における陰性コントロールとしている。

薬効の指標として、生存期間および day 120 での無病生存率、day 30 での血清 Mタンパク量を用いた。生存曲線を用いた検定には一般化 Wilcoxon 法（SPSS for windows ver. 6, SPSS inc.）を用いた。危険率 5 % 以下をもって有意と判断した。

血清 Mタンパクはヒト IgG として ELISA 法にて検出した。まず、マウス血清をあらかじめ抗ヒト IgG 抗血清をコートした 96 穴マイクロプレートに分注し、放置した。次にアルカリフォスファターゼ結合抗ヒト IgG 抗体を結合させ、SIGMA104 フォスファターゼ基質を添

加して発色させた、マイクロプレートリーダーにて吸光度を測定した。なお、標準ヒト IgGから得られた検量線から血清 M タンパク量を算定した。

抗 IL-6 受容体抗体単独投与群あるいはメルファラン 1 mg/kg 投与群においては、非投与群に対し延命効果は認められなかったが、両者を併用することにより、非投与群、両単独投与群に対し有意に延命した（図 7）。さらに、血清中 M タンパク量を移植後 30 日目に測定した結果においても、両者を併用することにより M タンパク量が低下していた（図 8）。メルファラン 3 mg/kg の場合、メルファラン単独投与で非投与群に対し有意に延命効果を示すが、抗体を併用することにより、単独投与に対しても有意に延命することができた（図 9）。また、day 120 における無病生存率は、3 mg/kg のメルファラン単独投与群では 2 / 7 であったが、抗体併用群は 4 / 7 に改善された（表 1）。

メルファランを投与することによりマウスに対し毒性を示し、体重の増加が抑制された（図 10）。メルファランと抗 IL-6 受容体抗体を併用した場合、抗腫瘍効果は増強したが、毒性（体重抑制）を拡大することにはなかった。

表 1 抗ヒトIL-6受容体抗体 hPM-1 とメルファランの  
併用による生存期間の延長

hPM-1 投 与	メルファラン 投 与 量	n	生存期間	延命率* (%)	無病率
—	CMC control	9	46.9±1.5	100	0 / 9
—	1 mg/kg	7	47.3±3.1	101	0 / 7
—	3 mg/kg	7	84.1±9.1	175	2 / 7
day 8	CMC control	7	55.1±5.2	118	0 / 7
day 8	1 mg/kg	7	68.6±7.5	146	0 / 7
day 8	3 mg/kg	7	110.0±5.1	235	4 / 7

延命率\* :  $100 \times (\text{薬剤投与群} / \text{薬剤非投与群})$

生存期間は群の平均値±標準誤差で表示した。

抗IL-6受容体抗体とメルファランを併用することにより、MPおよびVAD療法に対し耐性となった患者由来細胞株であるKPMM2に対し、有意に延命効果を増強することが示された。

実施例 3. ヒト骨髓腫細胞のSCIDマウス移植系における抗ヒトIL-6受容体抗体と化学療法剤の併用効果—抗体の in vivo用量依存性に関する検討

実施例 2 により、抗ヒトIL-6受容体抗体はメルファランの抗腫瘍効果を増強することが示された。そこで抗ヒトIL-6受容体抗体とメルファランの併用投与における、抗ヒトIL-6受容体抗体の用量依存性を調べた。

抗腫瘍活性の評価には、実施例 2 と同じく KPMM2細胞を尾静脈より移植することで作成した Xenograftモデル動物を用いた。すなわち、in vivoにて継代していた KPMM2細胞を細切後、メッシュを通して単細胞懸濁液としたものを細胞密度  $3 \times 10^5$  / ml に調製し、マウス 1 匹あたり 0.2 ml ずつ尾静脈より移植した（マウス 1 匹あたり



$6 \times 10^6$  個)。なお、この細胞移植日をday 0とした。

抗ヒトIL-6受容体抗体 hPM-1は、6.57mg/mlの濃度でリン酸ナトリウム緩衝液中に保存していた原液を用いて、5, 1, 0.2, 0.04 mg/mlの各溶液を作成した。これらをday 14にマウス体重10gあたり0.1mlずつ尾静脈より投与することにより50, 10, 2, 0.4 mg/kg weight 投与群を作成した。対照群には、抗体を含まない同溶液を同様に投与した。

メルファラン (melphalan, L-PAM, Sigma Chemical Co.製) は、0.2% CMC水溶液に懸濁して0.1mg/mlとして用いた。これをday 7から5日間連日マウス体重10gあたり0.1mlずつ経口投与し、1 mg/kg weight とした。対照群には、メルファランを含まない0.2% CMC水溶液を同様に投与した。

実験は、以下の10群にておこなった。(A)メルファラン非投与および抗体非投与群、(B)メルファラン単独投与群、(C)抗体各用量単独投与4群(50, 10, 2, 0.4 mg/kg weight)、(D)メルファランおよび抗体各用量併用4群(50, 10, 2, 0.4 mg/kg weight)。非投与群は、一群12匹、メルファラン単独投与群は、一群6匹、それ以外の群は7匹とした。また、同一系統、同一購入日のマウスを腫瘍移植せずに飼育し、Mタンパク検出における陰性コントロールとした。Mタンパク量の算定は、実施例2に記載の方法でおこなった。

薬効の指標として、生存期間、day 30, day 35, day 42での血清Mタンパク量を用いた。生存期間の検定には生存曲線を用いた一般化Wilcoxon法 (SPSS for windows ver. 6, SPSS inc.) を用い、危険率5%以下をもって有意と判断した。血清Mタンパク量の検定には、最初に、ANOVA法 (Analysis of variance, SPSS for windows ver. 6, SPSS inc.) をおこない、有意性を確認した後Bonferro

ni法（SPSS for windows ver. 6, SPSS inc.）を用い、危険率 5 % 以下をもって有意と判断した。

非投与群および抗体各用量単独投与群では、day 35の時点で死亡例が出現したため、day 30の血清Mタンパク量で比較した。一方、メルファラン単独投与群、メルファランおよび抗体併用群はday 30での血清Mタンパク量が非常に低く、投与した抗ヒトIL-6受容体抗体がMタンパクとして検出され、アッセイに影響することから、day 35とday 42のデータについて比較した。

まず、day 30において、抗体単独投与群は、いずれの投与量においてもMタンパク量を有意に抑制することはできなかったが、メルファランは単独投与で有意にこれを抑制した（図11）。次に、day 35, day 42において、メルファラン単独投与に対する抗体投与による併用効果を検討した。その結果、10mg/kg、2 mg/kg、0.4mg/kgの抗IL-6受容体抗体を併用することにより、有意なMタンパク量の減少が認められた（図12, 13）。

生存期間については、抗体単独投与群はいずれの投与量においても有意な延命効果を認めなかった。また、メルファランは単独で有意な延命効果を示したが、抗体と併用することによりさらにその効果は増強された（表2）。いずれの投与量においても延命効果の増加傾向を示していた。また、一般化 Wilcoxon法によりメルファラン単独投与群に対し、有意性が認められたのは、0.4mg/kgおよび50mg/kg投与群であった（図14）。

表2 抗ヒトIL-6受容体抗体 hPM-1とメルファランの  
併用による生存期間の延長

hPM-1 投 与	メルファラン 投 与	n	生存期間	延 命 率 (%)
—	CMC control	12	41.0±1.7	100
50mg/kg	CMC control	7	41.6±1.0	101
10mg/kg	CMC control	7	40.4±1.7	99
2 mg/kg	CMC control	7	41.4±1.3	101
0.4mg/kg	CMC control	7	40.3±1.2	98
—	1 mg/kg	6	58.2±1.8	142 (100)
50mg/kg	1 mg/kg	7	65.7±3.9	160 (113)
10mg/kg	1 mg/kg	7	64.3±2.7	157 (111)
2 mg/kg	1 mg/kg	7	63.3±2.3	154 (109)
0.4mg/kg	1 mg/kg	7	63.7±1.1	155 (110)

延命率：100×（薬剤投与群／薬剤非投与群）

ただし、カッコ内はメルファラン単独投与群をコントロール  
としている。

生存期間は、群の平均値±標準誤差で表示した。

以上より、抗IL-6受容体抗体をメルファランと併用した場合、  
0.4mg/kg～50mg/kgのいずれの用量においても、抗腫瘍効果を示  
した。

メルファランを投与することにより、マウスに対し毒性を示し体  
重の増加が抑制された。メルファランと抗ヒトIL-6受容体抗体を  
用いた場合、抗腫瘍効果は増強したが、毒性（体重抑制）を拡大す  
ることはなかった。したがって、骨髓腫治療においてメルファラン  
投与時の効果増強ならびに投与量の低減、メルファラン耐性の克服  
などに有用である可能性が示唆された。

特許協力条約第13規則の2に基づく寄託された微生物への言及  
寄託機関の名称及びあて名

寄託機関：工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号

受託番号

寄託日

FERM BP-2998

1990年7月10日

寄託機関：National Collections of Industrial and Marine  
Bacteria Limited

あて名：23St Macher Drive, Aberdeen AB2 1RY,

UNITED KINGDOM

NCIMB 40366 1991年2月11日

NCIMB 40362 1991年2月11日

## 請 求 の 範 囲

1. ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と組合わせて使用するための、抗IL-6受容体抗体を含んで成る骨髓腫治療剤。
2. 抗IL-6受容体抗体がモノクローナル抗体である請求項1に記載の骨髓腫治療剤。
3. 前記モノクローナル抗体がPM-1抗体である請求項2に記載の骨髓腫治療剤。
4. 前記PM-1抗体が再構成ヒトPM-1抗体である請求項3に記載の骨髓腫治療剤。
5. 前記ナイトロジェンマスタード系抗癌剤がメクロレタミン、ナイトロジェンマスタードN-オキシド、メルファラン、ウラムスチン、イホスファミド、クロラムブシル又はシクロホスファミドである、請求項1～4のいずれか1項に記載の骨髓腫治療剤。
6. 前記ナイトロジェンマスタード系抗癌剤がメルファランであり、そして前記抗IL-6受容体抗体が再構成ヒトPM-1抗体である、請求項1～5のいずれか1項に記載の骨髓腫治療剤。
7. 抗IL-6受容体抗体と組合わせて使用するための、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤を含んで成る骨髓腫治療剤。
8. 抗IL-6受容体抗体がモノクローナル抗体である請求項7に記載の骨髓腫治療剤。
9. 前記モノクローナル抗体がPM-1抗体である請求項8に記載の骨髓腫治療剤。
10. 前記PM-1抗体が再構成ヒトPM-1抗体である請求項9に記載の骨髓腫治療剤。
11. 前記ナイトロジェンマスタード系抗癌剤がメクロレタミン、ナイトロジェンマスタードN-オキシド、メルファラン、ウラムス

チン、イホスファミド、クロラムブシル又はシクロホスファミドである、請求項7～10のいずれか1項に記載の骨髄腫治療剤。

12. 前記ナイトロジェンマスタード系抗癌剤がメルファランであり、そして前記抗IL-6受容体抗体が再構成ヒトPM-1抗体である、請求項7～11のいずれか1項に記載の骨髄腫治療剤。

13. ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と抗IL-6受容体抗体とを含んで成る骨髄腫治療剤。

14. 抗IL-6受容体抗体がモノクローナル抗体である請求項13に記載の骨髄腫治療剤。

15. 前記モノクローナル抗体がPM-1抗体である請求項14に記載の骨髄腫治療剤。

16. 前記PM-1抗体が再構成ヒトPM-1抗体である請求項15に記載の骨髄腫治療剤。

17. 前記ナイトロジェンマスタード系抗癌剤がメクロレタミン、ナイトロジェンマスタードN-オキシド、メルファラン、ウラムスチン、イホスファミド、クロラムブシル又はシクロホスファミドである、請求項13～16のいずれか1項に記載の骨髄腫治療剤。

18. 前記ナイトロジェンマスタード系抗癌剤がメルファランであり、そして前記抗IL-6受容体抗体が再構成ヒトPM-1抗体である、請求項13～17のいずれか1項に記載の骨髄腫治療剤。

19. 治療を必要とする対象にナイトロジェンマスタード系抗癌剤と組合わせて抗IL-6受容体抗体を投与することを含んで成る骨髄腫治療法。

20. 抗IL-6受容体抗体がモノクローナル抗体である請求項19に記載の骨髄腫治療法。

21. 前記モノクローナル抗体がPM-1抗体である請求項20に記載の骨髄腫治療法。

22. 前記PM-1抗体が再構成ヒトPM-1抗体である請求項21に記載の骨髓腫治療法。

23. 前記ナイトロジェンマスタード系抗癌剤がメクロレタミン、ナイトロジェンマスタードN-オキシド、メルファラン、ウラムスチン、イホスファミド、クロラムブシル又はシクロホスファミドである請求項19に記載の骨髓腫治療法。

24. 前記ナイトロジェンマスタード系抗癌剤がメルファランであり、そして前記抗IL-6受容体抗体が再構成ヒトPM-1抗体である、請求項19に記載の骨髓腫治療法。

25. ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と組合わせて使用する骨髓腫治療剤の製造のための抗IL-6受容体抗体の使用。

26. 抗IL-6受容体抗体がモノクローナル抗体である請求項25に記載の使用。

27. 前記モノクローナル抗体がPM-1抗体である請求項26に記載の使用。

28. 前記PM-1抗体が再構成ヒトPM-1抗体である請求項27に記載の使用。

29. 前記ナイトロジェンマスタード系抗癌剤がメクロレタミン、ナイトロジェンマスタードN-オキシド、メルファラン、ウラムスチン、イホスファミド、クロラムブシル又はシクロホスファミドである、請求項25～28のいずれか1項に記載の使用。

30. 前記ナイトロジェンマスタード系抗癌剤がメルファランであり、そして前記抗IL-6受容体抗体が再構成ヒトPM-1抗体である、請求項25～41のいずれか1項に記載の使用。

31. 抗IL-6受容体抗体と組合わせて使用する骨髓腫治療剤の製造のためのナイトロジェンマスタード系抗癌剤の使用。

32. 抗IL-6受容体抗体がモノクローナル抗体である請求項31に

記載の使用。

33. 前記モノクローナル抗体がPM-1抗体である請求項32に記載の使用。

34. 前記PM-1抗体が再構成ヒトPM-1抗体である請求項33に記載の使用。

35. 前記ナイトロジェンマスタード系抗癌剤がメクロレタミン、ナイトロジェンマスタードN-オキシド、メルファラン、ウラムスチン、イホスファミド、クロラムブシル又はシクロホスファミドである、請求項31～34のいずれか1項に記載の使用。

36. 前記ナイトロジェンマスタード系抗癌剤がメルファランであり、そして前記抗IL-6受容体抗体が再構成ヒトPM-1抗体である、請求項31～35のいずれか1項に記載の骨髓腫治療剤。

37. 骨髓腫治療剤の製造のためのナイトロジェンマスタード系抗癌剤と抗IL-6受容体抗体の使用。

38. 抗IL-6受容体抗体がモノクローナル抗体である請求項37に記載の骨髓腫治療剤。

39. 前記モノクローナル抗体がPM-1抗体である請求項38に記載の使用。

40. 前記PM-1抗体が再構成ヒトPM-1抗体である請求項39に記載の使用。

41. 前記ナイトロジェンマスタード系抗癌剤がメクロレタミン、ナイトロジェンマスタードN-オキシド、メルファラン、ウラムスチン、イホスファミド、クロラムブシル又はシクロホスファミドである、請求項37～40のいずれか1項に記載の使用。

42. 前記ナイトロジェンマスタード系抗癌剤がメルファランであり、そして前記抗IL-6受容体抗体が再構成ヒトPM-1抗体である、請求項37～41のいずれか1項に記載の骨髓腫治療剤。



Fig.1

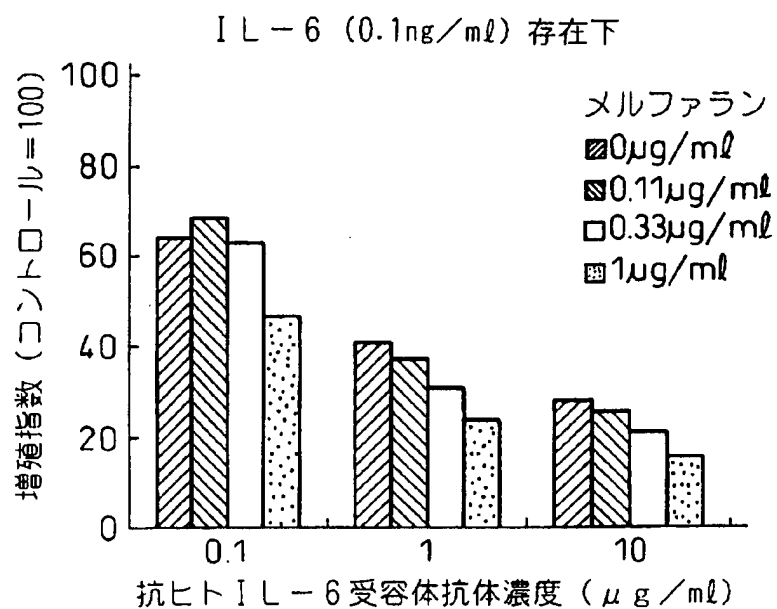


Fig.2

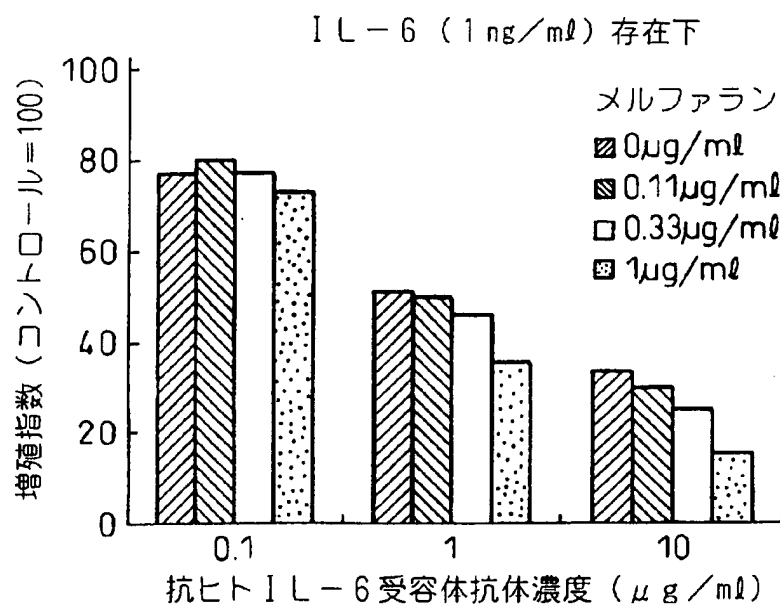


Fig. 3

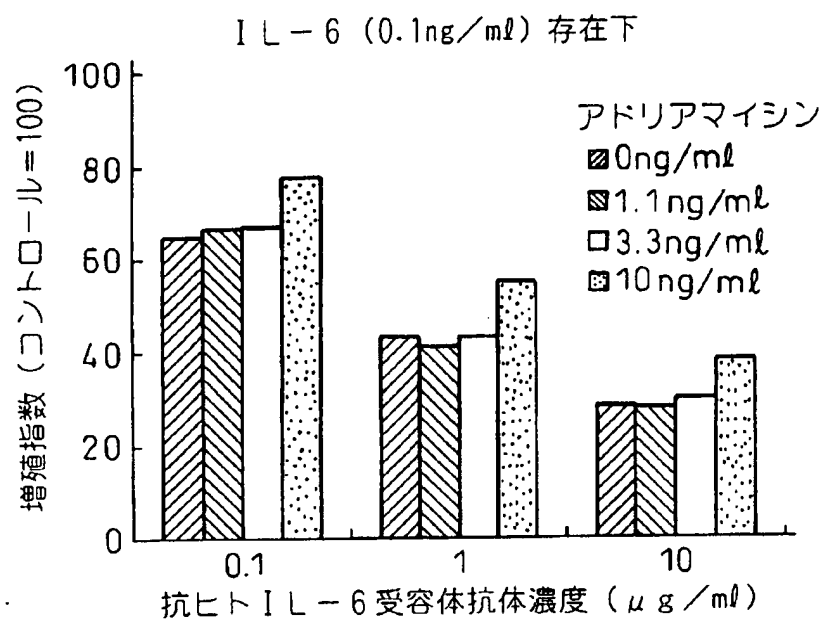


Fig. 4

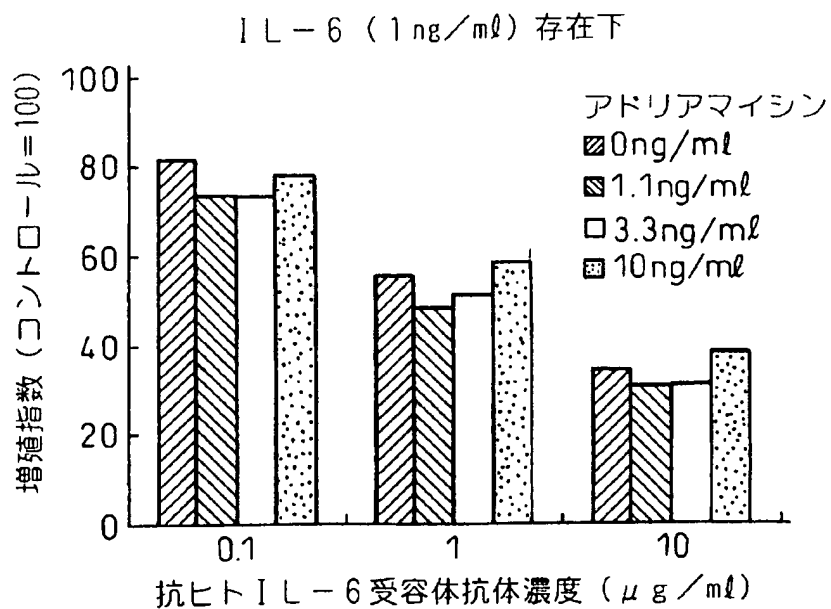


Fig.5

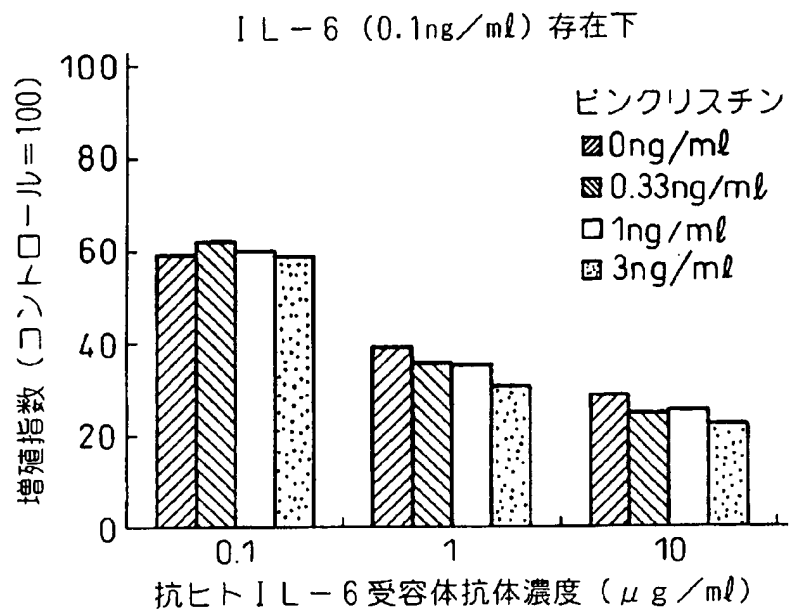


Fig.6

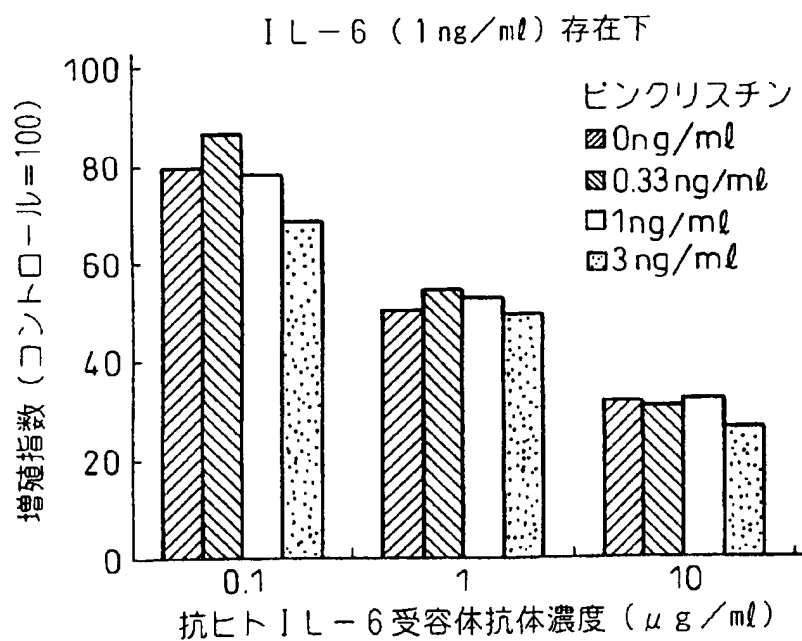
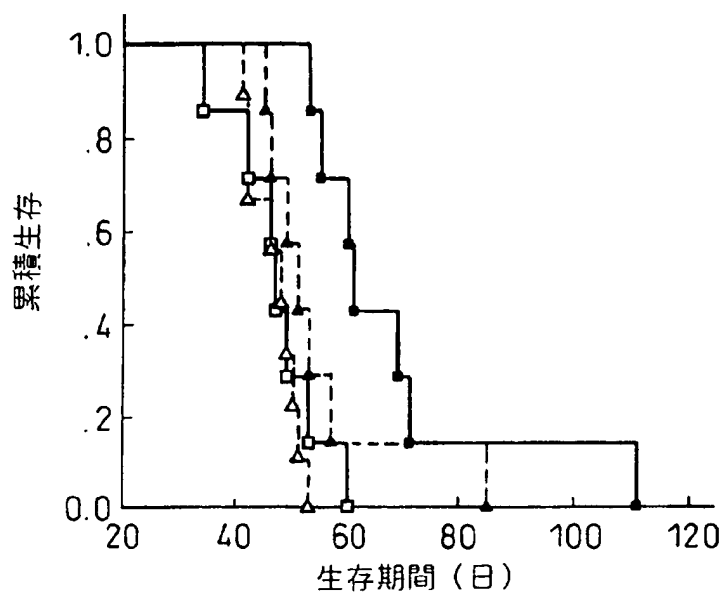
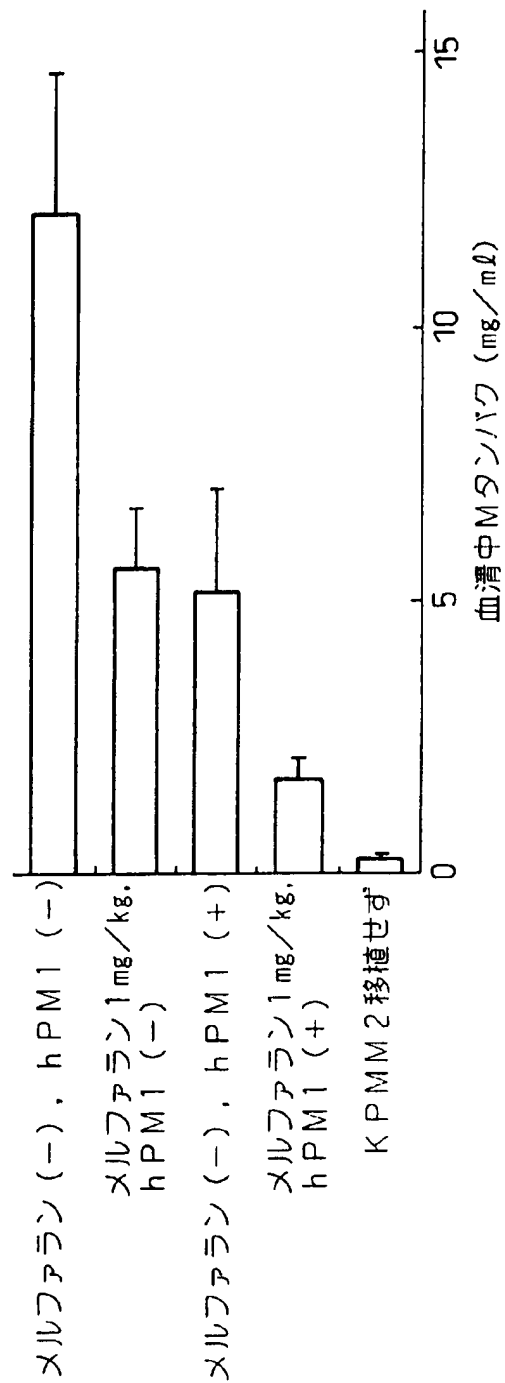


Fig.7



- hPM1 (+) メルファラン (+)
- -★- hPM1 (+) メルファラン (-)
- hPM1 (-) メルファラン (+)
- -☆- hPM1 (-) メルファラン (-)

Fig. 8



表示は、平均値 + S. E.

Fig.9

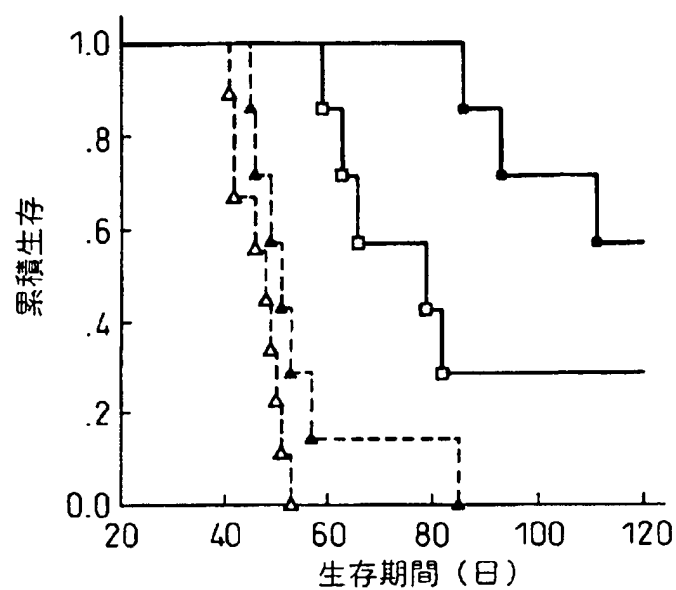


Fig.10

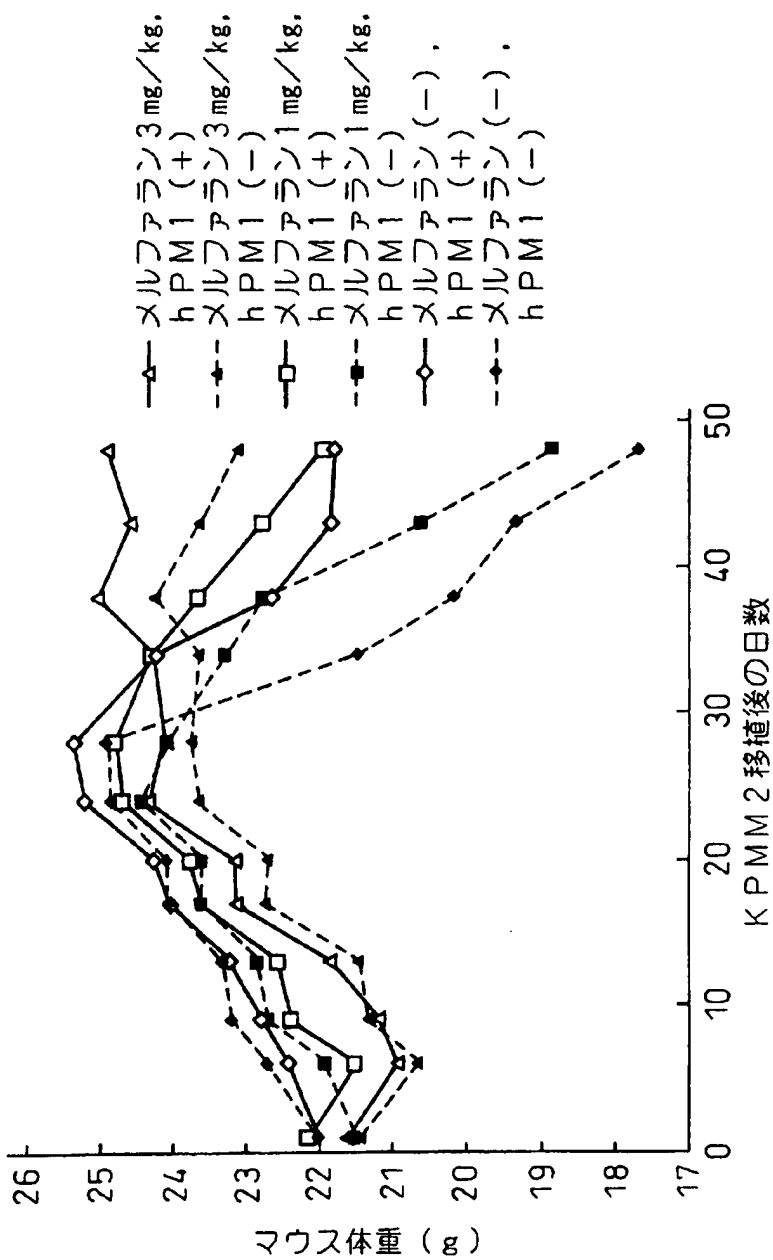


Fig.11

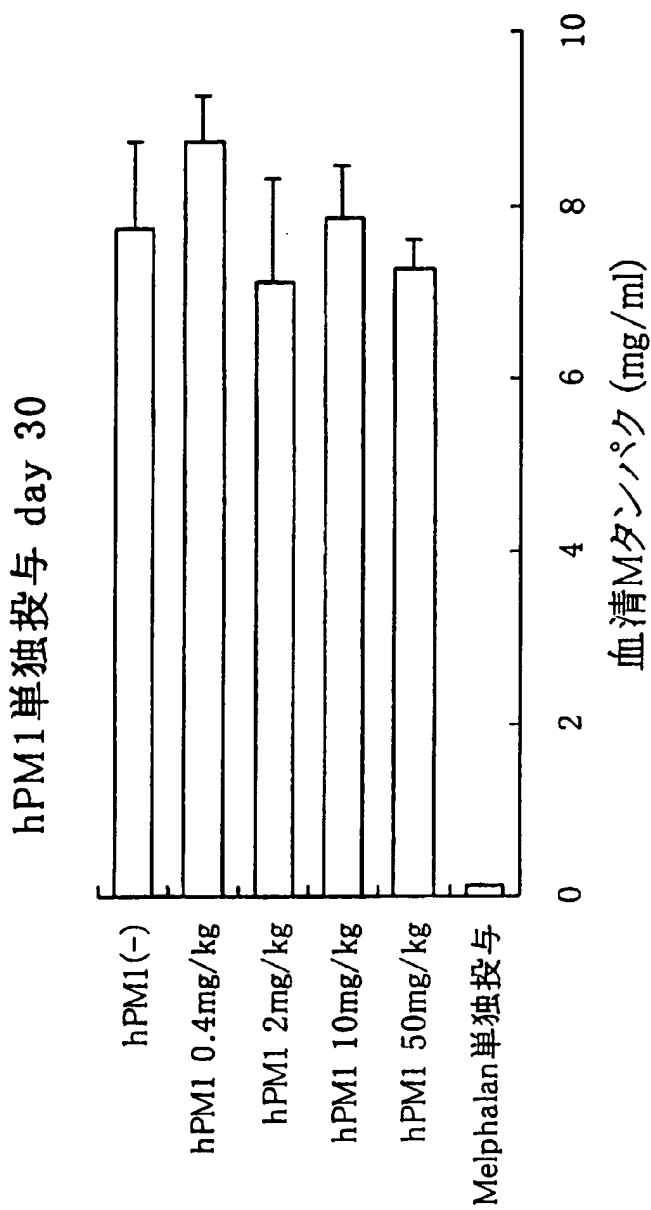




Fig.12

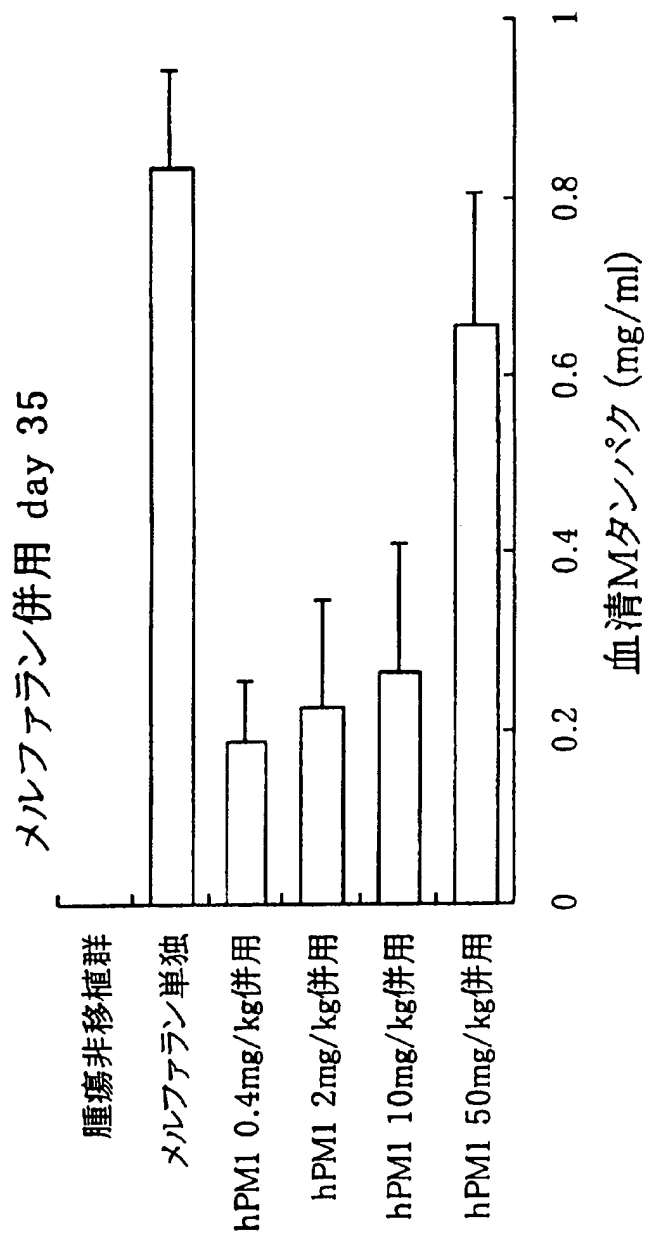
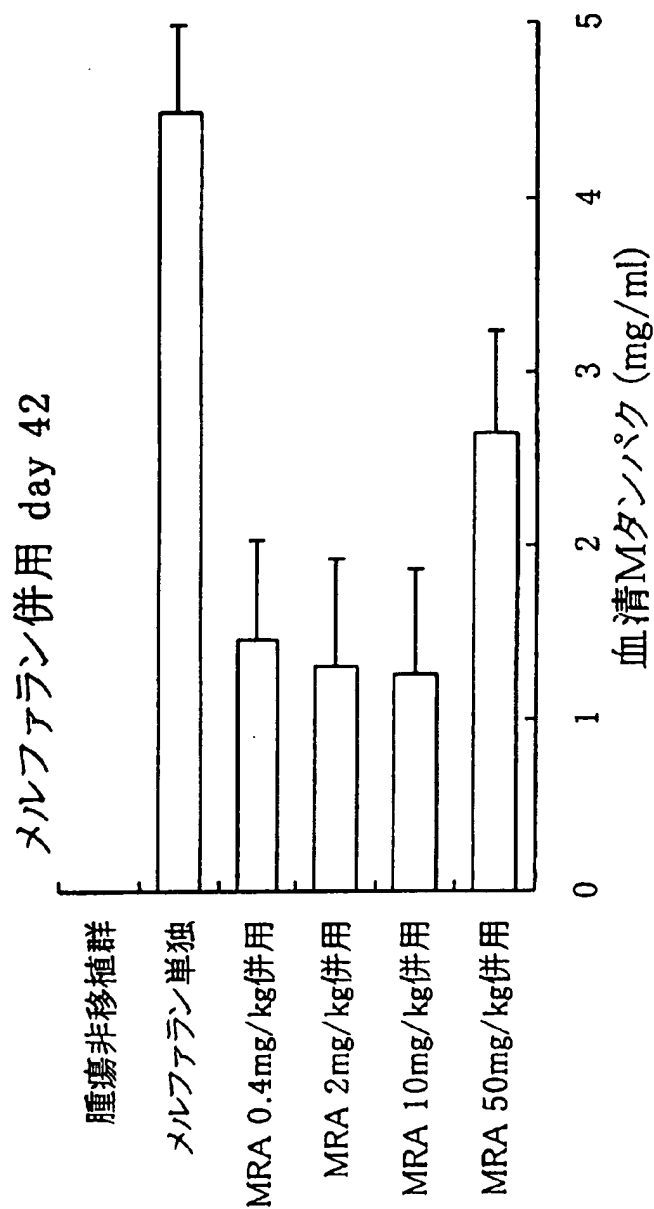


Fig. 13



表示は、平均値+S.E.

Fig.14

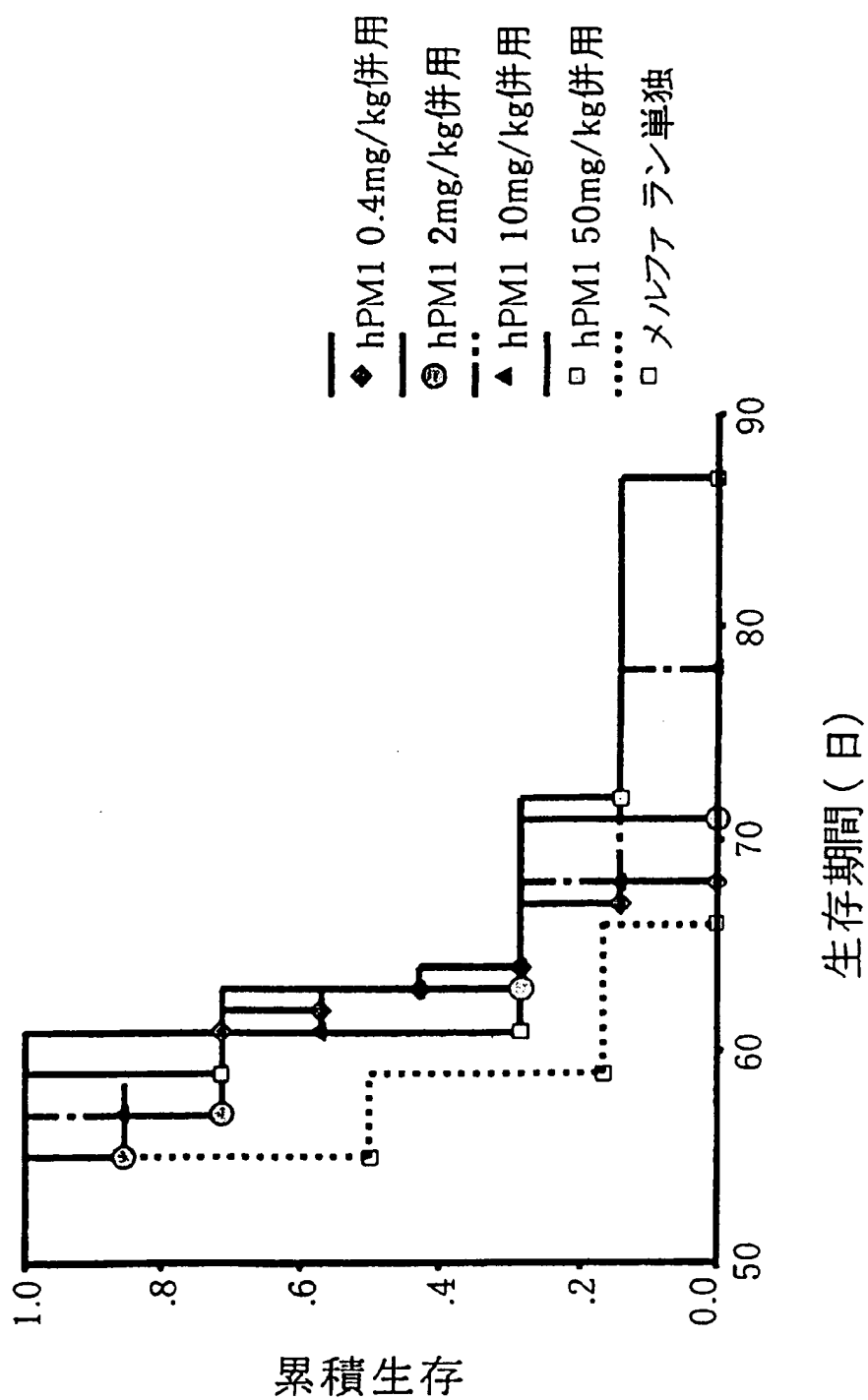


Fig.15

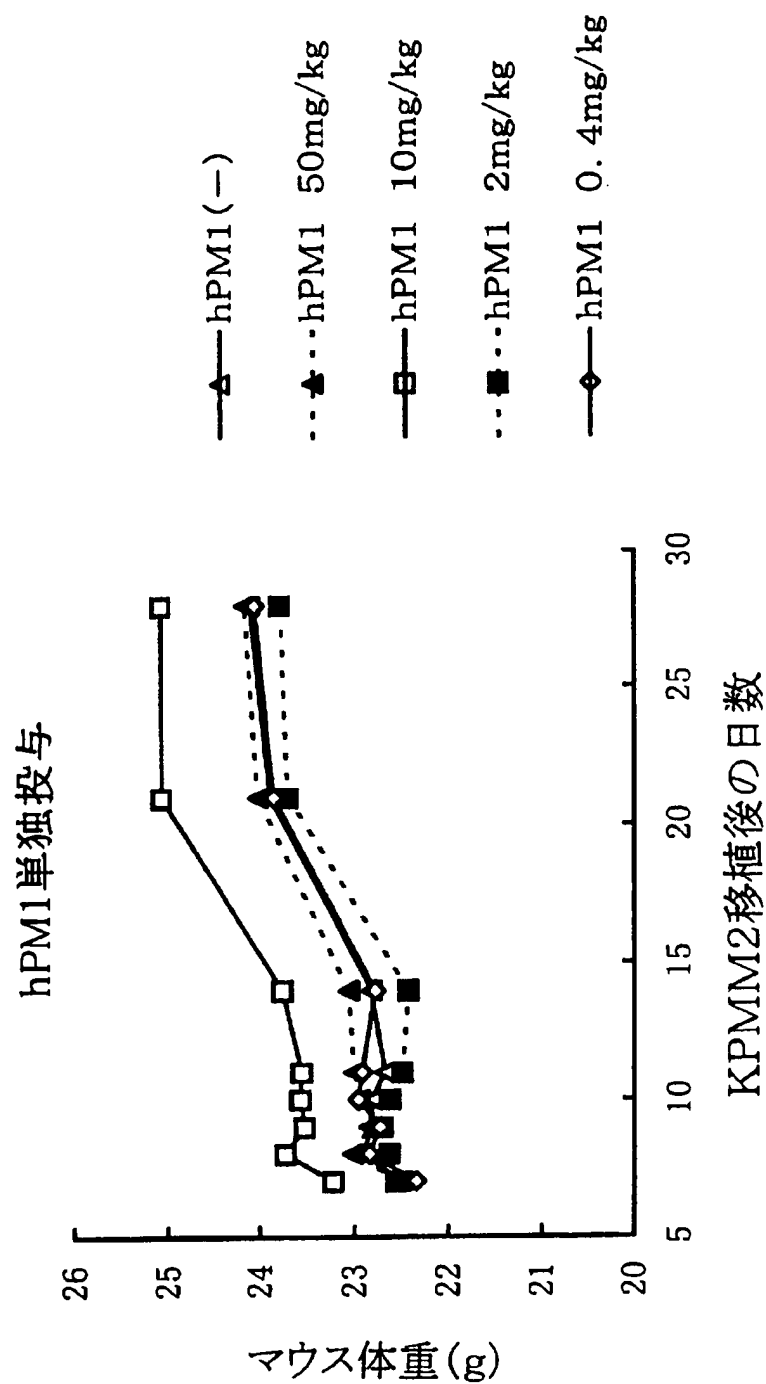
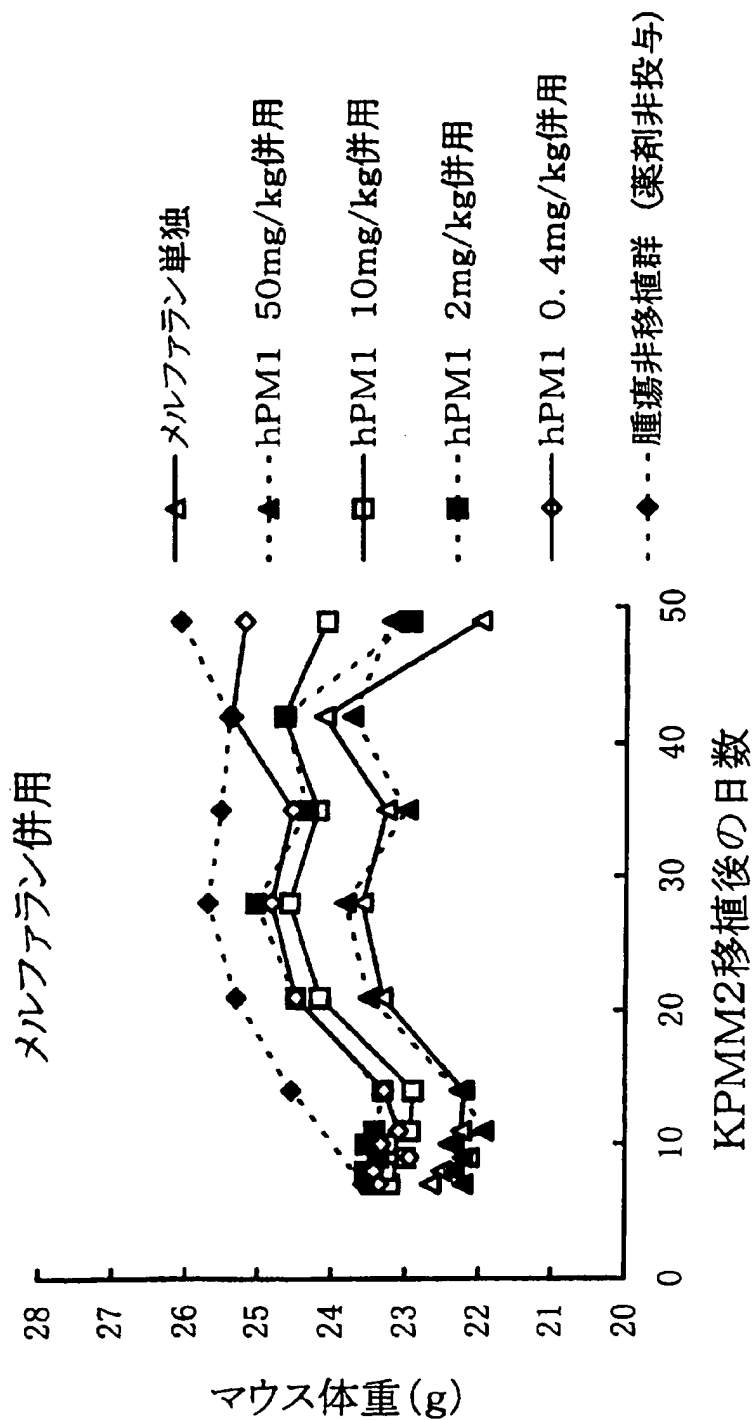


Fig.16



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02246

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int. Cl <sup>6</sup> A61K39/395, 31/13, 31/195, 31/505, 31/675 // C07K15/28, C12P21/08 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl <sup>6</sup> A61K39/395, 31/13, 31/195, 31/505, 31/675, C07K15/28, C12P21/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ONLINE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MANNING, Linda S. et al., "Assessment of the therapeutic potential of cytokines, cytotoxic drugs and effector cell populations for the treatment of multiple myeloma using the 5t33 murine myeloma model", Immunology and Cell Biology, 1995, Vol. 73, No. 4, pp. 326-332	1-18, 36-42
Y	ANTHES, John C. et al., "Interferon- $\alpha$ down-regulates the interleukin-6 receptor in a human multiple myeloma cell line, U266", Biochem. J., 1995, Vol. 309, No. 1, pp. 175-180	1-18, 36-42
Y	WO, 92/19759, A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), November 12, 1992 (12. 11. 92)	1-18, 36-42
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search September 2, 1997 (02. 09. 97)		Date of mailing of the international search report September 9, 1997 (09. 09. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl<sup>8</sup> A61K39/395, 31/13, 31/195, 31/505, 31/675 // C07K15/28, C12P21/08

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl<sup>8</sup> A61K39/395, 31/13, 31/195, 31/505, 31/675, C07K15/28, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	MANNING, Linda S. et al, "Assessment of the therapeutic potential of cytokines, cytotoxic drugs and effector cell populations for the treatment of multiple myeloma using the 5t33 murine myeloma model", Immunology and Cell Biology, 1995, Vol. 73, No. 4, pp. 326-332	1-18, 36-42
Y	ANTHES, John C. et al, "Interferon- $\alpha$ down-regulates the interleukin-6 receptor in a human multiple myeloma cell line, U266", Biochem. J., 1995, Vol. 309, No. 1, pp. 175-180	1-18, 36-42
Y	WO、92/19759, A (中外製薬株式会社) 12. 11. 92	1-18, 36-42

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 09. 97

国際調査報告の発送日

09.09.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

神谷下 浩一

4 C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3453



<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>A61K 39/395, 31/13, 31/195, 31/505,</b> <b>31/675 // C07K 16/28, C12P 21/08</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO97/49428</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1997年12月31日(31.12.97)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP97/02246  <b>(22) 国際出願日</b> 1997年6月27日(27.06.97)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平8/167325      1996年6月27日(27.06.96)      JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 中村明人(NAKAMURA, Akito)[JP/JP] 赤松健一(AKAMATSU, Kenichi)[JP/JP] 〒412 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 冨和特許法律事務所 Tokyo, (JP)		<b>(81) 指定国</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>添付公開書類</b> 改訂された国際調査報告書 (88) 改訂された国際調査報告書の公開日 : 1998年3月19日(19.03.98)
<b>(54) Title: REMEDIES FOR MYELOMA TO BE USED TOGETHER WITH NITROGEN MUSTARD ANTITUMOR AGENTS</b>  <b>(54) 発明の名称</b> ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と組合わせて使用するための骨髄腫治療剤  <b>(57) Abstract</b> Remedies for myeloma wherein nitrogen mustard antitumor agents and an anti-IL-6 receptor antibody are used together. Namely, remedies for myeloma containing the anti-IL-6 receptor antibody which are to be used together with the nitrogen mustard antitumor agents; remedies for myeloma containing the nitrogen mustard antitumor agents which are to be used together with the anti-IL-6 receptor antibody; and remedies for myeloma containing the nitrogen mustard antitumor agents and the anti-IL-6 receptor antibody.		



(57) 要約

ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と抗IL-6受容体抗体との併用による、骨髄腫治療剤。すなわち、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤と組合わせて使用するための、抗IL-6受容体抗体を含んで成る骨髄腫治療剤；抗IL-6受容体抗体と組合わせて使用するための、ナイトロジェンマスタード系抗癌剤を含んで成る骨髄腫治療剤；並びにナイトロジェンマスタード系抗癌剤と抗IL-6受容体抗体とを含んで成る骨髄腫治療剤。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパブリック第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア山ユーゴスラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	HU	ハンガリー	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TR	トルコ
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MR	モリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IS	アイスランド	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	NE	ニジェール	US	米国
CG	コンゴ	JP	日本	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	KE	ケニア	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CJ	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KR	大韓民国	PT	ポルトガル		
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ共和国	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LK	スリランカ	SE	スウェーデン		
EE	エストニア						

REVISED  
VERSION

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02246

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int. Cl<sup>6</sup> A61K39/395, 31/13, 31/195, 31/505, 31/675 // C07K16/28,  
C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> A61K39/395, 31/13, 31/195, 31/505, 31/675, C07K16/28,  
C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MANNING, Linda S. et al., "Assessment of the therapeutic potential of cytokines, cytotoxic drugs and effector cell populations for the treatment of multiple myeloma using the 5t33 murine myeloma model", Immunology and Cell Biology, 1995, Vol. 73, No. 4, pp. 326-332	1-18, 36-42
Y	ANTHES, John C. et al., "Interferon- $\alpha$ down-regulates the interleukin-6 receptor in a human multiple myeloma cell line, U266", Biochem. J., 1995, Vol. 309, No. 1, pp. 175-180	1-18, 36-42
Y	WO, 92/19759, A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), November 12, 1992 (12. 11. 92)	1-18, 36-42

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

September 2, 1997 (02. 09. 97)

Date of mailing of the international search report

September 9, 1997 (09. 09. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02246

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 19 - 35  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 19 to 35 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl<sup>6</sup> A61K39/395, 31/13, 31/195, 31/505, 31/675 // C07K16/28, C12P21/08

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl<sup>6</sup> A61K39/395, 31/13, 31/195, 31/505, 31/675, C07K16/28, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	MANNING, Linda S. et al, "Assessment of the therapeutic potential of cytokines, cytotoxic drugs and effector cell populations for the treatment of multiple myeloma using the 5t33 murine myeloma model", Immunology and Cell Biology, 1995, Vol. 73, No. 4, pp. 326-332	1-18, 36-42
Y	ANTHES, John C. et al, "Interferon- $\alpha$ down-regulates the interleukin-6 receptor in a human multiple myeloma cell line, U266", Biochem. J., 1995, Vol. 309, No. 1, pp. 175-180	1-18, 36-42
Y	WO、92/19759, A (中外製薬株式会社) 12. 11. 92	1-18, 36-42

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 09. 97

国際調査報告の発送日

09.09.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

神田 浩一

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3453

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの1の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 19-35 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲19-35は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの2の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ ~~FADED~~ TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**